

3. Materialien

3.1. Feinchemikalien und Lösungsmittel

Acrylamid 30 % (w/v) / Bisacrylamid 0,8 % (w/v) (37,5:1)	Roth
Agarose	Gibco BRL
Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin)	Sigma
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Merck
Bacto Agar	Becton
Binde-Silan	Pharmacia Biotech
Bradford-Färbereagenz (Coomassie™ Plus-200)	Pierce
Bromphenolblau	Sigma
BSA (Bovine Serum Albumin Fraction V)	PAA Laboratories
Calciumchlorid	Merck
Coomassie Brilliant Blue R-250	Pierce
Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)	Pharmacia
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DNA Leiter 1 kb (75-12216 bp), 0,1 mg DNA/ml	Fermentas MBI
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma
FKS (Fötale Kälberserum), hitzeinaktiviert	Gibco
Glucose für die Mikrobiologie	Merck
Glycerin	Merck
Glycin	Merck
Guanidinhydrochlorid	Sigma
Harnstoff	Gibco BRL
Hefeextrakt	Difco Laboratories
Imidazol (1,3-Diaza-2,4-cyclopentadiene)	Sigma

IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid)	BioVectra
Kaliumacetat	Merck
Lysozym	Roche
Magermilch	Uelzena
Manganchlorid	Merck
Methanol	Merck
MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Serva
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
BCIP-NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate / Nitro Blue Tetrazolium Tabletten)	Sigma
Poly-L-Lysin	Sigma
Protein“Rainbow marker” (14,3 - 220 kDa)	Pharmacia
Repel-Silan	Pharmacia Biotech
Rubidiumchlorid	Fluka
Saccharose	Merck
Salzsäure	Merck
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Invitrogen
Thiamin	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck
Trypton	Difco Laboratories
Tween 20	Sigma

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel hatten, soweit nicht anders angegeben, Analysenqualität.

3.2. Enzyme und DNA

Genomische DNA von <i>Neisseria meningitidis</i> Stamm MC58	AG Achtmann (Berlin)
<i>Platinum-Pfx</i> DNA-Polymerase	Gibco BRL
T4 DNA Ligase	New England BioLabs
Restriktionsenzyme: <i>XhoI</i> , <i>Bsp1201</i> , <i>Sall</i> , <i>NotI</i> , <i>EcoR1</i>	MBI Fermentas

Alle verwendeten Enzyme sind nach den Herstellervorschriften mit den mitgelieferten Reaktionspuffern eingesetzt worden.

3.3. Antikörper und Seren

Anti-Maus-IgG-(Fc spezifisch) AP-Konjugat	Sigma
Anti-Human-IgG-(Fab spezifisch) AP-Konjugat	Sigma
Anti-Human-IgM	Sigma
Anti-Maus-IgG (H+L) Cy TM 5-Konjugat	ImmunoResearch
Anti-Human-IgG (H+L) Cy TM 5-Konjugat	ImmunoResearch
Anti-Human-IgM, Fc5 μ Cy TM 5-Konjugat	ImmunoResearch
Anti-RGS-His	Sigma
Humanes Serum (Impfstoffkandidaten)	E. Wedege (Oslo)
Patienten Serum (Meningitis)	S. Heuberger (Graz)

3.4. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

E. coli SCS1/pSE111 (Büssow, 1998)

Pasmidvektor: pQE32-NST-BTattB (ein Derivat von pQE30NST) Genbank Accession Number GI:3328183

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde bei der Firma DLMBC (Berlin) durchgeführt.

Die Oligonukleotide wurden bei den Firmen Invitrogen und metabion bestellt und sind dem Anhang beigelegt.

3.5. Kits

QIAquick "PCR Purification Kit"	Qiagen
QIAEX II „Gel Extraktion Kit“	Qiagen
„HiSpeed Plasmid Midi Kit“	Qiagen
„QIAprep Spin Miniprep Kit“	Qiagen
Ni-NTA Superflow 96 BioRobot Kit	Qiagen

3.6. Gebrauchswaren

Mikrotiterplatten:

96 "wells" runder Boden	Greiner
96 "deep-wells" runder Boden	Qiagen
96 "deep-wells" flacher Boden	Qiagen
24 "deep-wells" flacher Boden	Qiagen
384 well Platten	Genetix
HisSorb-Platten	Qiagen
PVDF-Membran	Millipore
Blotting-Papier (Chromatographie Papier 3mm)	Whatmann
Petrischalen	Brand
PP-Röhrchen	Greiner
FAST™-Slides	Schleicher & Schuell
Aldehyd-Slides	Telechem
Objektträger	Menzel-Gläser
Fühlerlehrenband (Metallstreifen)	Perschmann

3.7. Geräte

BioRobot 8000	Qiagen
Brutschrank	Heraeus

Elektrophoresesysteme:

Gelkammer (Agaroseflachbettgele) 7 cm x 10 cm

Gelkammer (Proteingele) 80 cm x 100 cm

Gelkammer (Proteingele) 335 cm x 100 cm

Blot-Apparatur (TransBlot)

Analysenwaage

Feinwaage

Magnetrührer

Mikrowellengerät

pH-Meter

Werkstatt MPI

Werkstatt MPI

C.B.S. Scientific

BioRad

Mettler AT250

Mettler P1210

Heidolph

AEG-Berlin

Piccolo plus HI1295

Photometer:

Elisa Reader: SpectraMax 250

Spektralphotometer: Ultrospec 3100 pro

Scanner (ScanArray4000)

Molecular Devices

Pharmacia Biotech

Perkin Elmer

Schüttelinkubatoren:

New Brunswick Scientific G25

New Brunswick Scientific G24

New Brunswick Scientific inova4330

Spannungsquelle

Spotter (Q-Array)

Thermoblock

Thermostat

Thermozykler

UV-Transilluminator mit Kamera

Vortex Genie2

Zentrifugen:

Sigma 4 K 15

Beckman Coulter Avanti J-20

Eppendorf Centrifuge 5415 C

Pharmacia Biotech

Genetix

Eppendorf

Köttermann

MJ Research

Herolab

Bender&Hohbein

3.8. Computerprogramme und *online* Datenbanken

Genepix Pro 4,1		Axon Instruments, USA
Vector NTI		InforMax
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST	
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	
Swiss-Prot	http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/swissfetch?	
Neisseria	http://www.tigr.org	

3.9. Medien

- LB-Medium:

auf ein Liter	10 g Trypton	
	5 g Hefeextrakt	
	10 g NaCl	pH 7,5

Sterilisiert durch Autoklavierung.

- 2xYT-Medium:

auf ein Liter	16 g Trypton	
	10 g Hefeextrakt	
	5 g NaCl	pH 7,0

- SB-Medium:

auf ein Liter	12 g Trypton	
	24 g Hefeextrakt	
	4 ml Glycerin	

Nach dem Autoklavieren wird auf 170 mM KH_2PO_4 und 720 mM K_2HPO_4 eingestellt.

- SOC-Medium:

auf ein Liter	20 g Trypton	
	5 g Hefeextrakt	
	0,5 g NaCl	pH 7,0

Nach dem Autoklavieren werden 5 ml 2 M MgCl_2 und 5 ml 2 M MgSO_4 sowie 10 ml 40 % (w/v) Glucose hinzugefügt.

4. Methoden

4.1. Molekularbiologische Methoden

4.1.1. DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde angewandt, um ausgewählte DNA Abschnitte aus *Neisseria meningitidis* vom Stamm MC58 zu amplifizieren. Ausgangsmaterial war genomische DNA, wobei für jedes Genfragment spezifische Primer gelegt wurden. Die verwendeten Primer bestanden aus 21 sequenzspezifischen Nukleotiden und einer 5'-gelegenen Adaptorregion. Um eine Proteinexpression zu ermöglichen, wurden die 5' Primer in Frame gelegt. Die PCR-Amplifikation erfolgte mit Hilfe der *Platinum-Pfx* DNA Polymerase (2,5 U/ μ l). Der Reaktionsansatz besaß ein Volumen von 50 μ l und enthielt ca. 250 ng genomische DNA sowie je 10 pmol Primer, 2 mM MgSO₄ und eine dNTP-Konzentration von je 10 mM in PCR-Reaktionspuffer. Zuerst wurde das Reaktionsgemisch 5 Minuten bei 94 °C denaturiert, dann begann der eigentliche Zyklus mit einem Denaturierungsschritt von 30 Sekunden bei 94 °C. Es folgte ein Hybridisierungsschritt 30 Sekunden lang, dabei wurde die Temperatur den Primern angepaßt, diese ließ sich näherungsweise aus dem GC-Gehalt berechnen und lag damit zwischen 50 °C und 60 °C. Danach folgte der Polymerisationsschritt 90 Sekunden lang bei 72 °C. Dieser Zyklus wurde in der Regel 25 – 30 mal wiederholt, abschließend folgte ein fünfminütiger Polymerisationsschritt, der dazu diente, noch unvollständige, einzelsträngige Bereiche aufzufüllen. Zur Kontrolle wurde ein Teil des Reaktionsansatzes mit DNA-Probenpuffer (0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 40 % (w/v) Saccharose) versetzt und eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte dann entweder direkt mit dem PCR-Purification-Kit von QIAGEN, oder wenn sich noch Nebenbanden zeigten, durch präparative Gelextraktion.

4.1.2. DNA Agarose-Gelelektrophorese

Für die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agaroseflachbettgele (7 cm x 10 cm) mit einer Agarosekonzentration von 0,7 % (w/v) eingesetzt. Das Gel enthielt 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid für die DNA Detektion und als Gel-

und Laufpuffer diente TAE-Puffer (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA). Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 50 V, d.h. 7 V/cm. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden im Verhältnis 1:10 mit DNA Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Als Größenstandardmarker diente eine 1 kb DNA-Leiter. Die Geldokumentation erfolgte mit einem UV-Transilluminator mit Kamera. Bei präparativen Gelen wurden die gewünschten Banden ausgeschnitten und die Gelelution wie unter Punkt 4.1.3 beschrieben durchgeführt.

4.1.3. Präparative Gelextraktion

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten wurde das QIAEX II System von QIAGEN verwendet. DNA bindet an Silikat-Membranen in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze und wird durch Lösungen mit geringer Salzkonzentration wieder eluiert. Die DNA-Bande wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem 3 – 5-fachen Volumen eines Hochsalzpuffers QX1 (enthält Natriumperchlorat) sowie 10 µl Glasmilch versetzt. Der Ansatz wurde gemischt und die Agarose vollständig bei 50 °C innerhalb von 10 min aufgelöst. Nach Zentrifugation erfolgten drei Waschschriffe des Glasmilchpellets, ein Waschschriff mit 400 µl des Hochsalzpuffers QX1, sowie zwei mit je 400 µl eines Salz-Ethanol-Puffers PE. Das Pellet wurde getrocknet und in 20 - 50 µl H₂O oder TE-Puffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert, kurz bei 50 °C inkubiert, die Glasmilch durch Zentrifugation pelletiert, und das Eluat in ein Reaktionsgefäß überführt.

4.1.4. Vektorpräparation (Plasmidisolierung)

Als Plasmidvektor diente pQE32-NST-BTattB, ein in der Arbeitsgruppe aus dem Vektor pQE30NST (GI:3328183) modifizierter Expressionsvektor. Der Vektor wurde aus dem Konstrukt pQE32-NST-BTattB-GAPDH durch Restriktionsverdau gewonnen. Dazu wurde das Plasmid mit Hilfe des “Plasmid Midi Kit” von QIAGEN isoliert. Die Zellen einer Übernacktkultur (200 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin inkubiert bei 30 °C) wurden nach der Ernte (10 min, 6.000 x g, 4 °C) in 4 ml Puffer P1 (50 mM Tris-Cl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch

Zugabe von 4 ml Puffer P2 (200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS), es wurde vorsichtig durchmischt und anschließend mit 4 ml kaltem Puffer P3 (3,0 M $\text{KC}_2\text{H}_3\text{O}_2$, pH 5,5) neutralisiert. Danach wurde die Probe erneut gemischt und anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Die dabei ausgefallenen Proteine, chromosomale DNA sowie andere unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (20 min, 20.000 x g, 4 °C) und der Überstand auf eine zuvor in Puffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % (v/v) Isopropanol, 0,15 % (v/v) Triton X-100) äquilibrierte Anionenaustauschersäule (QIAGEN-tip-100-Säule) gegeben, an welche die Plasmid-DNA band. Die Säule wurde zweimal mit je 10 ml Puffer QC (1,0 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % (v/v) Isopropanol) gewaschen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 15 % (v/v) Isopropanol) eluiert, dann durch Zugabe von 4 ml Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt und sofort abzentrifugiert (50 min bei 15.000 x g). Das Pellet wurde mit 2 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet, die DNA in 400 μl H_2O aufgenommen und weiter verwendet. Die Ausbeute an Plasmid-DNA betrug 138 μg . Zur Vorbereitung des Vektors auf die Ligation wurden 10 μg DNA in einem Gesamtvolumen von 100 μl mit 250 U *SalI* und 50 U *NotI* in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer 5 h bei 37 °C verdaut. Im Anschluß wurden die DNA-Fragmente durch präparative Gelelektrophorese getrennt, und die Vektorbande (3,5 kb) mittels Gelextraktion isoliert. Da der Vektor mit zwei Restriktionsenzymen verdaut worden war, war hier eine Dephosphorylierung der Vektor-DNA nicht nötig. Er konnte daher direkt zur Ligation eingesetzt werden.

4.1.5. Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Es wurden Restriktionsendonukleasen der Klasse II eingesetzt. Diese spalten doppelsträngige DNA an ihren Erkennungsstellen sequenzspezifisch, wobei die Schnittstelle je nach Spezifität der Endonuklease glatt ("blunt ends") oder versetzt sein kann ("sticky ends"). Die Restriktion der PCR-Produkte erfolgte in der Regel mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *Bsp120I*, die kompatible Enden zum *SalI/NotI*-geschnittenen Vektor generierten. Zeigte der Genabschnitt für diese Enzyme jedoch interne Schnittstellen, wurde entsprechend auf die Enzyme *NotI* oder *SalI* ausgewichen. Die

Restriktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 30 µl und enthielt etwa 0,2 µg DNA, 50 U Enzym und den vom Hersteller mitgelieferten Puffer (Tango Puffer) in einer 1 x Endkonzentration. Der Ansatz wurde 5 h bei 37 °C inkubiert und das Enzym anschließend 20 min lang bei 80 °C inaktiviert.

4.1.6. QIAquick PCR-Purification

Der PCR-Ansatz oder Restriktionsansatz wurde mit der 5fachen Menge an PB Puffer versetzt, einem Puffer mit hoher Salzkonzentration und saurem pH-Wert und auf eine Minisäule mit Silikat-Matrix gegeben (oberhalb von pH 2,0 sind die Phosphatgruppen der Nucleinsäure negativ geladen und binden an das Säulenmaterial, während die weit weniger stark negativ geladenen Proteine unter diesen Bedingungen durchlaufen). Es wurde nochmals mit dem Hochsalzpuffer PB gewaschen, um Verunreinigungen abzulösen, und schließlich die DNA mit dem EB-Puffer, einem Puffer geringer Salzkonzentration (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) zu eluieren.

4.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl über Nacht bei 16 °C durchgeführt. Die Ligation erfolgte mit einem Unit T4-DNA-Ligase unter Verwendung des vom Hersteller mitgelieferten Ligasepuffers. Dabei wurde versucht, das molare Verhältnis Insert:Plasmid auf ungefähr 3:1 einzustellen, um eine möglichst effiziente Insertion der gewünschten Sequenz in das geschnittene Plasmid zu erreichen.

4.1.8. Herstellung Hitzeschock-kompetenter *E. coli* Zellen

Um *E. coli* transformationskompetent zu bekommen, wurde die klassische Methode mit Calcium- und Rubidiumchlorid von Cohen *et al.*, 1972 angewandt. Dabei wird die Zellwand der Bakterien durch CaCl₂ und RbCl modifiziert, was die Kompetenz der *E. coli* Zellen freie DNA aufzunehmen, künstlich erhöht. Die Kompetenz der Zellen liegt bei 1 x 10⁷ Transformanden pro µg Plasmid-DNA.

Die verwendeten *E. coli* SCS1/pSE111 Zellen (Büssow *et al.*, 1998) besaßen eine vom Helferplasmid kodierte Kanamycinresistenz. 4 ml LB-Medium mit 15 µg/ml Kanamycin wurden mit einer Einzelkolonie dieses *E. coli* Stammes angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Hauptkultur (1.000 ml LB-Medium mit 15 µg/ml Kanamycin) wurde im Verhältnis 1:10 mit der Übernachtskultur beimpft und im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,5 angezogen. Im Anschluß wurden die Zellen 30 min auf Eis abgekühlt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4 °C. Nach der Zellernte (10 min, 2.000 x g) wurde das Pellet vorsichtig in 30 ml TFB I (10 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin, 30 mM KC₂H₃O₂ pH 5,8, 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂) resuspendiert und 10 min lang auf Eis gestellt. Dann wurde das Gemisch erneut zentrifugiert (10 min, 1.000 x g) und das Pellet in 3 ml TFB II (10 mM MOPS pH 7,0, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde frisch verwendet oder aliquotiert (200 µl), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

4.1.9. Transformation durch Hitzeschock

Für die Transformation wurden 60 µl kompetente Zellen mit 5 µl des Ligationsansatzes vermischt und für 30 min auf Eis gestellt. Es folgte ein 1 minütiger Hitzeschock bei 42 °C und eine erneute Inkubation von 2 min auf Eis. Dem Ansatz wurden 900 µl SOC-Medium hinzugefügt und dieser 90 min bei 37 °C geschüttelt. Auf einem Selektivmedium (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin und 2 % (w/v) Glucose) wurde der komplette Ansatz ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.1.10. Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Kontrolle der Klonierung wurden Klone gepickt, und die Plasmid-DNA mit Hilfe des “Miniprep Kit” von QIAGEN isoliert. Einzelne Klone wurden in 10 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin und 2 % (w/v) Glucose überführt und über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Nach Zentrifugation (10 min, 3.000 x g, 4 °C) wurde das Zellpellet in 250 µl Puffer P1 mit 100 µg/ml RNase A resuspendiert. Die Zugabe von 250 µl Puffer P2 mit Natriumhydroxid bewirkte die Lyse der Zellen, die Lösung klärte sich und wurde durch die Freisetzung der bakteriellen DNA hochviskos. Aufgrund des basischen

Mediums denaturierte gleichzeitig die chromosomale DNA, und es folgte eine schnelle Zugabe von 350 µl Puffer N3 (enthält ein chaotrophes Salz und Essigsäure), um den Ansatz zu neutralisieren. Bei diesem Schritt fielen die chromosomale DNA und die denaturierten Proteine als weißer Niederschlag aus, die Plasmid DNA blieb in Lösung zurück. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (18.000 x g, 10 min) und der Überstand auf eine Spin-Säule mit einer Silikat-Membran gegeben, an welche die DNA band. Die Säule wurde je einmal mit 500 µl eines Hochsalzpuffers (PB) und mit 750 µl eines Salz-Ethanol-Puffers (PE) gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte mit einem Niedrigsalzpuffer (TE). Für den anschließenden Restriktionsverdau wurde das Enzym *EcoRI* verwendet. Der Ansatz enthielt 0,2 µg DNA und 25 U Enzym in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit dem entsprechenden Puffer. Die Inkubation erfolgte für 3 h bei 37 °C. Der Verdau wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft und positive Klone zur Sequenzierung gegeben. Die Sequenzierung erfolgte vom 5' Ende mit dem Primer pQE65.

4.1.11. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde durch eine photometrische Messung mit dem Spektralphotometer Ultrospec 3100 von Pharmacia durchgeführt. Die Nukleinsäurekonzentration läßt sich über die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmen, dabei entspricht 1 OD₂₆₀ einer Doppelstrang-DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989). Das Verhältnis von OD 260 zu OD 280 ist ein Maß für Verunreinigungen mit Proteinen. Bei sauberer DNA liegt das Verhältnis bei über 1,8.

4.2. Proteinchemische Methoden

4.2.1. Proteinexpression in *E. coli*

Die rekombinanten Proteine besaßen am N-terminus sechs Histidinreste (His₆) und konnten somit affinitätschromatographisch über Ni-Chelat Säulen gereinigt werden. Die spezifische Bindung der His₆-getaggtten Proteine an Metallchelatsäulen beruht auf der Tatsache, daß bei

neutralem bis basischem pH-Wert ein Stickstoffatom des Histidins im Imidazolring deprotoniert vorliegt und sein freies Elektronenpaar koordinative Bindungen zu Übergangsmetallkationen ausbilden kann. Die Zellanzucht erfolgte in vier 24er „deep-well“ Mikrotiterplatten. Die Klone wurden über Nacht bei 30 °C in 200 µl 2xYT Medium mit 15 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Ampicillin und 2 % (w/v) Glucose angezogen, dann mit 1.800 µl SB-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 20 µg/ml Thiamin, 15 µg/ml Kanamycin) ergänzt und die Proteinexpression nach etwa 2,5 h mit IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert. Die Zellernte erfolgte nach weiteren 4-5 h (3.000 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets bei -20 °C eingefroren. Die Reinigung der Proteine wurde unter denaturierenden oder nativen Bedingungen am Robotor im Batch-Aufreinigungsverfahren (BioRobot 8000) nach dem Protokoll des Herstellers mit Ni-NTA Superflow durchgeführt. Diese Ni-NTA-Beads besaßen eine Kapazität von 5 - 10 mg His-tag-Protein/ml Gel. Die Proteine wurden in 350 µl Elutionspuffer eluiert und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach Bradford.

Puffer für die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen:

Aufschlußpuffer: 6 M GuHCl, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, pH 8,0

Waschpuffer: 8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, pH 6,3

Elutionspuffer: 8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, pH 4,5

Puffer für die Aufreinigung unter nativen Bedingungen:

Aufschlußpuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0, Lysozym

Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0

Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0

4.2.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1979) wurde in modifizierter Weise angewandt. Diese Methode beruht auf der Bindung von Farbstoffmolekülen an das Protein und der damit verbundenen Verschiebung des

Absorptionsmaximums nach 595 nm und zeichnet sich durch eine relativ hohe Empfindlichkeit aus. In einer Mikrotiterplatte wurden 10 µl entsprechend verdünnte Proteinlösung mit 100 µl Bradford-Farbreagenz versetzt und der Ansatz 5 – 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte photometrisch bei 595 nm (Elisa Reader) im Konzentrationsbereich 10 – 200 µg/ml unter Zuhilfenahme einer Kalibriergeraden von BSA bekannter Konzentration.

4.2.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteingemischen in Gegenwart von SDS wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Abmessungen der Minigele betragen 80 x 100 x 0,75 mm bzw. für die Gele mit 106 Slots 335 x 100 x 1,0 mm. Die Länge des Sammelgels betrug jeweils 20 % des Trenngels. Die Proben wurden mit Probenpuffer (50 mM Tris-Cl pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 250 mM Glycin) und DTT versetzt und 10 min bei 100 °C denaturiert. Die Gelelektrophorese erfolgte im Laufpuffer (25 mM Tris-Cl pH 8,3, 0,1 % (w/v) SDS, 250 mM Glycin) bei einer Spannung von 80 V im Sammelgel und wurde auf etwa 120 V im Trenngel erhöht. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine etwa 1 h in Färbelösung (45 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,25% (w/v) Coomassie) fixiert, die Detektionsgrenze von Coomassie liegt bei ca. 40 ng Protein. Ungebundener Farbstoff konnte anschließend durch Waschen mit der Entfärbelösung (20 % Ethanol, 10 % Essigsäure in H₂O jeweils v/v) entfernt werden. Die Geldokumentation erfolgte photographisch.

Zusammensetzung Trenngel (12,5 %): 375 mM Tris-Cl pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 41,6 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,1 % (w/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED.

Zusammensetzung Sammelgel (4 %): 125 mM Tris-Cl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 13,3 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,1 % (w/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED.

4.2.4. Western-Blotting

Bei dieser Methode wurden die Proteine aus dem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid) elektrisch transferiert. Da die Proteine nicht kovalent an die Blotmembran binden, konnten sie für die nachfolgende Immundetektion immobilisiert werden. Der Transfer erfolgte nach dem "Semi-Dry-Verfahren". Dazu wurden Chromatographiepapier und Membran in Blotting-Puffer (20 mM Tris-Cl pH 8,0, 150 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) mindestens 10 min äquilibriert und mit dem Polyacrylamidgel folgendermaßen geschichtet: Die Membran wurde anodisch auf zwei Lagen Chromatographiepapier gelegt, darauf folgte das Polyacrylamidgel, zwei weitere Lagen Chromatographiepapier und abschließend als oberste Schicht die Kathode. Die Blotdauer betrug 1 h bei 5 mA/cm² Gelfläche. Im Anschluß wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt oder es folgte eine Immundetektion.

4.2.5. Immunchemische Nachweise mit Seren

Nach vollendetem Elektrobplot wurde die noch feuchte Membran zunächst mit 5 % (w/v) Magermilch in TBST (150 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7,5, 0,1 % (v/v) Tween 20) zur Absättigung der freien Bindungsstellen 2 h bei 4 °C inkubiert. Über Nacht folgte die primäre Antikörperreaktion mit Serum in der Verdünnung 1:100 in Blocklösung bei Raumtemperatur. Nach Entfernen überschüssiger Antikörper durch fünfmaliges Waschen mit TBST für je 10 min wurde die Membran mit Anti-Human-IgG alkalische Phosphatase-Konjugat (1:5000) in Blocklösung 2 h erneut bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch Waschen der Membran mit TBST entfernt. Die Membran wurde solange in Färbelösung (NBT-BCIP) geschwenkt, bis eine Anfärbung der Proteine erfolgte. Die Reaktion wurde mit Wasser gestoppt.

4.2.6. Dot-Immunassay

Der hochempfindliche Nachweis eines Proteins ist mit Hilfe der Immundetektion möglich. Dabei dient der Dot-Immunassay der schnellen Orientierung beim Test von Seren. Für den einfachen Dot-Blot wurden 2 µl der Proteinprobe direkt auf eine feuchte PVDF-Membran

pipettiert. Beim Dot-Blot im Mikromaßstab wurde die feuchte Membran auf einen Objektträger (2,5 cm x 7,5 cm) fixiert und je 5 nl des entsprechenden Proteins mit dem Q-Array-System in einem definierten 4 x 4 Muster aufgespottet. In beiden Fällen wurde die Membran wie unter 4.2.5. beschrieben weiter behandelt.

4.3. Microarrays

4.3.1. Herstellung der Microarrays

Protein- oder Antikörperarrays bestehen aus einer großen Anzahl von gleichmäßig arrangierten einzeln liegenden Spots aus z.B. Proteinen, Antikörpern oder Peptiden. Diese werden mit einem Roboter durch Pins aus der Lösung auf eine feste Trägeroberfläche übertragen.

Polyacrylamidoberfläche:

Als Geloberfläche wurde Polyacrylamid verwendet. Durch die poröse Oberfläche des Polyacrylamids diffundieren die Proteine in die Poren des Gels und werden durch van-der-Waals-Kräfte in ihrer hydrophoben unpolaren Umgebung fixiert. Die Gele für die Proteinarrays wurden zwischen zwei zuvor gereinigte Objektträger mit einem Spacer (30 – 80 µm) gegossen. Dabei wurde der eine Objektträger mit Binde-Silan-Lösung vorbehandelt, während der andere in eine Repel-Silan-Lösung getaucht wurde. Das Gel, ein 8 %-iges Polyacrylamidgel, blieb auf der Bindsilanseite haften und wurde direkt als Oberfläche zum Spotten der Proteine verwendet.

Poly-L-Lysin-Oberfläche:

Diese Oberflächen werden hauptsächlich für DNA Microarrays angewendet, denn die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA reagieren leicht mit den positiv geladenen Aminogruppen des L-Lysins. Für die Oberflächenbeschichtung wurden die Objektträger zuerst in einer Lösung von 10 % (w/v) NaOH und 60 % (v/v) Ethanol 2 h lang geschüttelt, um die Oberfläche aufzurauen. Danach folgte die Beschichtung mit 10 % (v/v) Poly-L-

Lysin in PBS (137 mM NaCl, 3,4 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) für 45 min bei Raumtemperatur.

4.3.2. Spotten

Zum Spotten, d.h. dem Transfer der Proteine auf die beschichtete Objektträgeroberfläche wurde ein Q-Array-Roboter von Genetix verwendet. Der Roboter war mit einem 16-Pin-Kopf ausgestattet und lief mit der Software Q-soft-200-Microarraying. Die rostfreien Stahlpins besaßen Enden mit einem Durchmesser von 150 µm. Die Proteine wurden in einem definierten 4 x 4 Muster in einem Abstand von 1250 µm gespottet. Dabei wird das Probenvolumen durch Adsorptionskräfte am Pinschaft gehalten und durch den direkten Kontakt mit der Microarrayoberfläche wieder abgegeben. Die Luftfeuchtigkeit in der Roboterammer betrug 60 % und die Spotttiefe 200 µm. 5 nl aufgereinigtes Protein wurden als Duplikate in zwei identische Felder gespottet. Als Kontrolle dienten Antikörper (Anti-Human-IgG und -IgM), die in Verdünnungsreihen mitgespottet wurden.

4.3.3. Serumscreening

Die mit Polyacrylamid sowie mit Poly-L-Lysin beschichteten Proteinarrays wurden mit 5 % (w/v) Magermilch in TBST (150 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH-7,5, 0,1 % (v/v) Tween 20) als Blockreagenz 2 h bei Raumtemperatur blockiert, und mit humanem Serum in der Verdünnung 1:100 oder dem entsprechenden Anti-Maus-RGS-His Antikörper in der Verdünnung 1:2000 in 5 % (w/v) Magermilch TBST bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach 5 Waschschritten mit TBST für je 10 min folgte die sekundäre Antikörperreaktion mit Fluoreszenz markiertem Cy5-Antikörper (Anti-Human- oder Anti-Maus-IgG bzw. -IgM, verdünnt 1:800 in 5 % (w/v) Magermilch / TBST) im Dunkeln bei Raumtemperatur für 2 h. Cy5 ist ein Cyan-Farbstoff, der den Vorteil einer hohen Photostabilität mit wenig Hintergrund besitzt (Absorption: 649 nm, Emission: 670 nm). Die Proteinarrays wurden 5 mal für je 10 min mit TBST und abschließend mit Wasser gewaschen, getrocknet und dann eingescannt.

Die käuflich erworbenen FAST-Slides von Schleicher & Schuell besaßen eine Nitrocellulose basierende Oberfläche (Schichtdicke 14 μm), die nach Angaben des Herstellers nicht mit Magermilch behandelt werden sollte. Daher wurde als Blockingreagenz fötales Kälberserum eingesetzt (3 % (v/v) FKS, 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS), die Antikörper ebenfalls in dieser Lösung verdünnt und wie oben beschrieben verfahren.

4.3.4. Scannen

Die Detektion der Fluoreszenz markierten Antikörper erfolgte mit einem Laserscanner, dem ScanArray 4000 (Perkin Elmer). Die Anregungs-Wellenlänge betrug 633 nm, die Emissionswellenlänge 670 nm. Es wurde mit einer Laserpower von 100 % und in einem Photomultiplierbereich von 60 – 80 % bei Polyacrylamid und Poly-L-Lysin beschichteten Arrays gescannt. Bei den FAST-Slides wurden niedrigere Multiplier-Einstellungen von etwa 30 – 40 % gewählt. Die Scanauflösung betrug bei allen Slides 10 μm .